

細菌が生産する膜小胞, メンブランベシクル

Bacterial Membrane Vesicles

豊福 雅典*, 黒沢 正治, 野村 暢彦

MASANORI TOYOFUKU, MASAHARU KUROSAWA and NOBUHIKO NOMURA

筑波大学大学院生命環境系 〒305-8572 茨城県つくば市天王台 1-1-1

* TEL/FAX: 029-853-5079

* E-mail: toyofuku.masanori.gf@u.tsukuba.ac.jp

Department of Life and Environmental Sciences, Department of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba,
Tennodai 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

キーワード: メンブランベシクル, 微生物間相互作用, バイオフィルム

Key words: membrane vesicle, bacterial interactions, biofilms

(原稿受付 2015年2月25日受付/原稿受理 2015年3月3日受理)

1. はじめに

多くの細菌は細胞外にメンブランベシクル (MV) と呼ばれる膜小胞を放出する (図1)。MVは細胞膜により形成され、タンパク質、核酸やシグナル物質などを含み、環境に放出された後に周囲の細胞に付着・融合する。従って、細胞間での様々な物質の輸送に関わると考えられている。MVは特にグラム陰性細菌で研究されてきたが、多くのグラム陽性細菌でも生産が確認され、MV生産は細菌に遍在する性質であると考えられている。グラム陰性細菌のMVは主に細胞外膜から構成されるため、しばしばアウトターメンブランベシクル

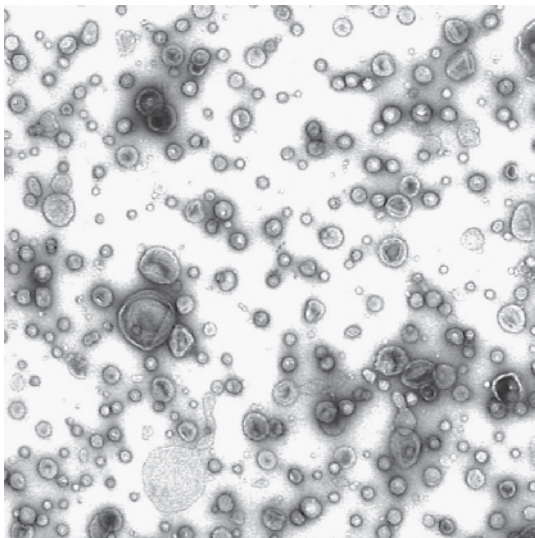


図1. *P. aeruginosa* が生産する MV の TEM 画像³⁾。Bar, 500 nm.

(OMV) とも呼ばれる。近年では実環境中からも MV は同定され、海洋中の物質循環に大きな役割を果たしていることが示唆された³⁾。MV 生産が普遍的に観察される中で、MV の生物学的な役割やその形成メカニズムについて多くの関心が寄せられている。さらには MV の特性がリポソームに類似するため、バイオナノテクノロジー技術の有用なプラットフォームとなりえ、MV を利用した応用研究についても注目が集まっている¹⁾。将来的には MV はドラッグデリバリーシステムに代表されるような、より効率的でスマートな次世代型微生物制御への応用が期待される。実環境中における複合微生物系の制御は活性汚泥法を含めたバイオレメディエーション技術の大きな課題であるが、MV を基盤とした技術革新によって複合微生物系をコントロールできる日が来るかも知れない。

2. MV の生物学的な役割

将来的な MV の利用のためには、その機能の理解は重要である。MV の生物学的な役割についてこれまで様々な報告がなされており、今後も増えていくと思われる。これまでに明らかになっているものについてまとめると、MV は大きく分けて二つの役割を持っている。それはすなわち、生産した細胞の生存に関わる役割と、周囲の細胞との相互作用に関わる役割である。

2.1 細胞の生存に関わる MV の役割

細胞の生存に関わる役割として、細胞内のストレスを緩和する作用がある。例えば、薬剤やペリプラズム内に蓄積したミスフォールドタンパク質によって MV 生産が誘導され、それによって薬剤やミスフォールドタンパク質が細胞外に排出される^{2,16)}。この作用に加えて MV

は外部からの攻撃に対して“おとり”として働く⁹⁾。バクテリオファージは細胞外膜を認識して宿主に感染することが知られている。MVは細胞外膜と同様な構成成分であるために、MVが存在するとファージはMVに捕捉され、その結果細胞の生存率が上昇する。同様にして、細胞膜に作用するペプチド系抗生物質に対してもMVの存在が細胞の生存率を上昇させる。

2.2 周囲の細胞との相互作用に関わる MV の役割

周囲の細胞との相互作用に関わる役割としては、遺伝子の水平伝播や宿主細胞への毒素タンパク質の運搬、微生物間コミュニケーションシグナルの伝達などが挙げられる。*Pseudomonas aeruginosa*は疎水性の高いシグナル物質、*Pseudomonas quinolone signal* (PQS)を生産することが明らかとなっていたが、この疎水性の高いシグナルが一体どのようにして細胞間で伝達されるのかについて議論となっていた。そこで細胞外に排出されたPQSの局在が調べられた結果、細胞外に排出されたPQSのほとんどはMVに含まれていることが明らかとなった¹¹⁾。PQSを含むMVを*P. aeruginosa*に与えると、PQS制御下の遺伝子発現が誘導されたことから、MVはPQSの伝達をなしうることが明らかとなった。PQSがMVに含まれる利点として、水環境中で拡散性が向上することが挙げられる他に、PQSが局所的に高濃度な環境を作り出し、周囲の細胞に効率よく運搬されていると考えられる。このようにMVは細菌にとって重要な様々な役割を有しており、細胞間相互作用を司ることもある。このようなMVの性質はドラッグデリバリーシステムに通じるものがあり、実際に利用が検討されている。

2.3 最近見つかった MV の新たな役割

MVの役割については最近では生態的な役割も見出されている。海洋中で存在量が多い*Prochlorococcus*がMVを生産することが新たに分かり、実際の海洋中からもMVが同定された³⁾。MVが他の細菌にとって栄養源となりうることから、MVが海洋の物質循環に多大な影響を与えることが推定されている。さらには植物病原細菌である、*Xylella fastidiosa*においては細菌が葉などの表面へ付着するのをMVが調節することによって、病原性をコントロールすることも示されている⁶⁾。

3. MV の形成機構

これまで述べてきたように様々な細菌においてMV生産の有無やMVの機能に関して報告されてきている。その機能の多様性はMVが単なる細胞の残渣ではないことを物語っている。それでは、一体どのようにしてMVは形成されるのだろうか？MV形成に関わる因子は数多く報告されてきているが、実はその詳細な形成メカニズムは未だ明らかとなっていない。これまでにMVが単なる溶菌で形成された構造物ではなく、その生産が様々な因子によって制御されていることが実験的に証明された。その理解はMV生産の人工的な制御にも繋がる。MVの形成機構についてはグラム陰性細菌においてMV形成に関わる環境因子や遺伝子の同定が試みられ、その結果から推測される形成メカニズムが複数提唱され

ている^{13,26)}。その一方で、グラム陽性細菌に対する知見は皆無である。ここでは主にグラム陰性細菌で得られている知見について解説する。しかしながら、以下に述べる研究の多くは特定遺伝子の変異株やノックアウト株を用いた実験であり、野生株の正常な生育においてMV形成がどのような分子制御プロセスを経ているのか、その全貌は明らかとなっていない。また、MVの生産は多くの細菌で見られる遍在的な現象であることが認知されてきている一方で、それを説明する普遍的なMV形成機構の存在は明らかとなっていない。

3.1 内膜と外膜の架橋の消失による MV 形成

グラム陰性細菌のMVは外膜から形成されることから外膜が何らかの影響で剥離し、小胞化するプロセスが必要となる。そこで重要な役割を果たすのが外膜-ペプチドグリカン (PG) -内膜間の架橋である。*Escherichia coli*や*P. aeruginosa*, *Salmonella*などを用いた研究において、リポタンパク質や外膜タンパク質の欠損株ではMV高生産性を示すことが報告された^{4,20)}。つまり、外膜-PG-内膜間の架橋が消失することで、外膜が剥離し、MV形成が誘導されるというモデルである。

3.2 膜の湾曲による MV 形成

細胞表面のアニオン性電荷間の反発による外膜の湾曲化もMV形成を引き起こす因子の一つである。B-band LPSの負電荷が電荷間の反発を生むことで膜が不安定となり、MVが形成されるというモデルが提唱された⁷⁾。同様に、*P. aeruginosa*の生産する細胞間シグナル物質の一つで負電荷をもつPQSがLPSと結合し、LPS分子間の反発力を強めることで外膜の湾曲化とMV形成を誘導するモデルも報告され¹²⁾、PQSの添加が*P. aeruginosa*のみならず他の細菌のMV形成を誘導することも報告されている²¹⁾。

3.3 ペリプラズムストレスによる MV の誘導

ペリプラズムにおける不要物質の蓄積と膨圧の上昇によるMV形成モデルも提唱されている。このモデルは*Porphyromonas gingivalis*を用いた研究で初めて示された。オートリシンの欠損株では細胞壁の分解が阻害されることでペリプラズム内に蓄積したPG断片によって膨圧が上昇し、外膜が押し出される形でMVが形成されると推測されている³³⁾。*E. coli*や*P. aeruginosa*においてもペリプラズムにおけるミスフォールドタンパク質の蓄積がMV形成を増加させることが報告されている^{15,24)}。

上記のモデルの他にも、膜の局所的な流動性の違いや細胞表面の湾曲性²²⁾、近年では鞭毛遺伝子などもMV生産に関わるものが提唱されている^{8,10)}。しかしながら、いずれも詳細なメカニズムについてはほとんど解明されていない。

4. 環境に応じた MV 形成

我々もこれまで*P. aeruginosa*を用いてPQSや二環化化合物の添加、アルギン産合成経路がMV形成に関与することなど、種々のMV形成メカニズム解析を進めて

きた^{21,23-25)}。そこから見えてくるものは、同一菌種においても様々な MV 誘導および形成機構が存在するということである。以下 *P. aeruginosa* を用いて分かってきた最近の知見について紹介する。

P. aeruginosa は広く土壌から海洋にまで生息する環境常在菌であり、酸素のある好気条件下で生息できるだけでなく、嫌気条件下では硝酸を利用した脱窒を介してエネルギーを生産できる。この脱窒環境下ではバイオフィーム形成や、微生物間コミュニケーション（クォラムセンシング）関連遺伝子の発現が好気条件下とは大きく異なり、条件によって異なる生態を示すことを我々の研究を含め明らかにしてきた^{5,29,32)}。*P. aeruginosa* はクォラムセンシングシステムとして三つの異なるシグナル物質を使い分けており、特筆すべきことに PQS は合成に酸素を必要とするため、嫌気条件下では生産されない²⁸⁾。この PQS は *P. aeruginosa* の MV 形成に必須であるとされたため、嫌気条件下では MV は形成されないと予測されていた¹⁹⁾。そんな中、我々は嫌気条件下で MV が形成されているのを観察した。興味深いことに、その形成量は好気条件下の 6 倍近くであり、嫌気条件下で MV 生産を促進させるメカニズムが推定された³¹⁾。

4.1 *P. aeruginosa* の嫌気条件下での MV 生産経路

グラム陰性細菌において MV は主に細胞外膜から構成されるため、多くの外膜タンパク質を含む一方で内膜タンパク質は少ないという特徴を持つ。*P. aeruginosa* が嫌気条件下で生産した MV のタンパク質組成を解析したところ、外膜と似たタンパク組成であった³¹⁾。それに加えて pyocin 由来のタンパク質が蓄積されていることが明らかとなった。Pyocin は *P. aeruginosa* が生産するバクテリオシンの一種であり、自身とは異なる系統の *P. aeruginosa* を溶菌させる。従って、PAO1 株が生産した pyocin は PAO1 株には効かない。この pyocin はストレス応答、すなわち SOS 応答の制御下に入っており、DNA 損傷ストレスなどによって生産が促進される。これまでいくつかの報告で、*P. aeruginosa* が生産した MV に pyocin 由来のタンパク質が含まれていることが明らかとなっていたが³⁰⁾、MV における役割については未解明であった。MV はストレス存在下で誘導されること、また、pyocin もストレス存在下で誘導されることも踏まえて、この両者には何か重要な接点があると考えて解析を行った。その結果、pyocin 生産遺伝子を欠損させると、嫌気条件下における MV 生産量は著しく低下することが示された。一方で、好気条件下では pyocin 生産遺伝子は MV 形成に影響しなかった。これらの結果は、*P. aeruginosa* が条件によって異なる MV 誘導機構を持つことを示す。現在 pyocin 生産がどのように MV 形成を誘導しているのかについて詳細な解析を行っている（現在投稿中）。それでは、なぜ嫌気条件下で pyocin によって MV が誘導されているのだろうか？先程 *P. aeruginosa* は嫌気条件下で脱窒を行うことを説明したが、その過程で一酸化窒素 (NO) が生産される。NO は核酸合成を阻害することからそれが引き金となり、SOS 応答が活性化し、pyocin 生産が誘導され、その結果 MV が誘導されている。自身が生産する NO 以外に他の細菌が生産した NO や宿主細胞が生産する NO に応答する形で

MV が誘導されることが示唆される。MV の細胞間における役割を考えると、今後の解析が期待される。

4.2 バイオフィームで生産される MV

実環境中の細菌の多くはバイオフィームを形成して集団生活をおくっていることが明らかとなっている。バイオフィームの一番の特徴として、細胞同士を接着させる細胞外マトリクスの存在が挙げられる。細胞外マトリクスは細胞同士や細胞と基質の接着を担い、抗生物質等の外からの刺激に対しても細胞を守る役割を持つ。その構成成分についてはこれまでに主に多糖について研究され、*P. aeruginosa* においては pel, psl, アルギン酸が同定されている。しかしながら、*P. aeruginosa* や環境サンプルなどにおいて多糖よりもタンパク質の含有量が多いことがしばしば観察されていた¹⁴⁾。また、MV が細胞外マトリクスに含まれていることも明らかとなっていた¹⁹⁾。それにも関わらず、その詳細についてはよくわかっていない。筆者らは *P. aeruginosa* バイオフィームにおいて、どのようなタンパク質が細胞外マトリクスに含まれるのかをプロテオーム解析によって同定した³⁰⁾。ここで、興味深いことに非常に多くの細胞外膜タンパク質が同定された。細胞外マトリクスで検出された上位 20 のタンパク質を見渡すと、実にそのうちの 15 ものタンパク質が外膜タンパク質であった。一方で、内膜タンパク質は非常に少なかった。この結果は、同定されたタンパク質が細胞残渣由来である可能性が低いことを示す。なぜこれほどまでに外膜タンパク質が存在するのか考えたところ、MV 由来ではないかという結論に辿り着いた。そこでバイオフィームの細胞外マトリクスから MV を精製し、そのタンパク質組成を解析したところ、細胞外マトリクスで同定されたタンパク質のおよそ 30% の種類は MV 由来であることが示唆された。これらの結果より、バイオフィーム中で活発に MV が生産されていることが示され、さらにはそれらが細胞外マトリクスタンパク質の大部分を占めていることが示された。

4.3 バイオフィームと浮遊細胞由来の MV の比較

MV は環境に応じてその誘導機構が異なってくることから、環境に応じて異なる性質や機能が付与された MV が生産されている可能性がある。そこで、バイオフィームと浮遊細胞由来の MV に含まれるタンパク質を網羅的に同定して、比較した³⁰⁾。その結果、*P. aeruginosa* の浮遊細胞が生産する MV には、毒素因子が含まれていた一方で、バイオフィーム由来の MV には毒素因子は含まれておらず、浮遊細胞由来の MV からは同定されなかった鉄獲得に関わるタンパク質が多数同定された。*P. aeruginosa* が生産する MV はプロテアーゼ等の毒素因子を含むことから、感染宿主に対する MV の役割がこれまで注目されていた。しかしながら、今回新たに解明されたバイオフィーム由来の MV は従来報告されていたような毒素因子は含まれておらず、新たな役割を担っていると考えられる。鉄の獲得は細菌にとって生存戦略上非常に重要であり、そのために、鉄獲得システムは高度に発達している。バイオフィーム中では慢性的な鉄不足に陥ると考えられているが、MV が鉄のキャリアーになりうることは他の細菌で報告されており¹⁷⁾、バ

イオフィーム中での鉄の獲得や蓄積にも MV は寄与しているのかもしれない。MV のバイオフィームでの機能を明らかにするには更なる解析が必要であるが、多糖などの細胞外マトリクスがバイオフィームの骨格であるとする、MV はそこに様々な機能を付与できるアクセサリ的な要素を持っていることが想像できる。実際に多糖と思われる繊維状の構造物に MV が付着しているのが観察されている。

5. MV の応用展開

MV はすでにワクチンとしての利用が研究されており、今後も様々な応用事例が増えていくと思われる。上述したように MV は環境や生活スタイル（浮遊 vs バイオフィーム）によってその中身が変化する。この中身の変化はおそらく MV の機能そのものに影響を与えることが推察される。こうした MV の性質を積極的に利用する事によって MV をナノテクノロジーのプラットフォームとしても今後利用できることが期待される¹⁾。MV は細胞間相互作用に関わる物質輸送システムであることから、我々は MV を改良することによって、特定の活性や機能を付与した MV を特定の細胞に輸送することが任意に行えるようになると考えている。このような技術は複合微生物系の中で特定の微生物群のみを制御したいニーズの高いバイオレメディエーションの現場に対して有効となる。また、臨床においては常在菌に影響をほとんど与えずに病原性細菌のみ抗生剤を届けるようなドラッグデリバリーシステムの構築に寄与する。当該技術の構築に向けて、MV の基礎的な知見を蓄積し、そこに根ざした MV 改変技術の確立が必須である。MV は細胞外膜から形成されるために、その改変は比較的簡便に行える。例えば、細胞のリポ多糖 (LPS) 組成を改変すれば、MV の LPS 組成もそれに伴って変化する。また、我々は任意のタンパク質を細胞外膜に局在させることで、そのタンパク質を含んだ MV を作製させることにも成功している (図 2)。以上のように MV を改変し、その挙動や機能を地道に解析していくことによって、MV デザイン化の方法論が構築されると思われる。さらに、ここで得られる知見を既存のリポソーム工学の知見と融合させることによって、革新的な技術が生まれることが期待される。

当グループでは排水処理に関わる微生物機能が微生物間コミュニケーションによって制御できることを解明しており^{27,28)}、現状より環境低負荷な排水処理システムの構築のために、活性汚泥中での微生物間コミュニケーションの制御を目指している。すでに微生物間コミュニケーションで使われるシグナル物質が MV によって運搬されることを見出し、MV を利用したバイオテクノロジー技術に取り掛かっている。また、MV の応用はこうした輸送システムのみならず、物質生産においては、通常は菌体外に排出されない有用物質を MV によって排出させることも可能であると考えている。以上のような MV の利用価値の高さから MV 生産を任意にコントロールできるシステムを開発している。

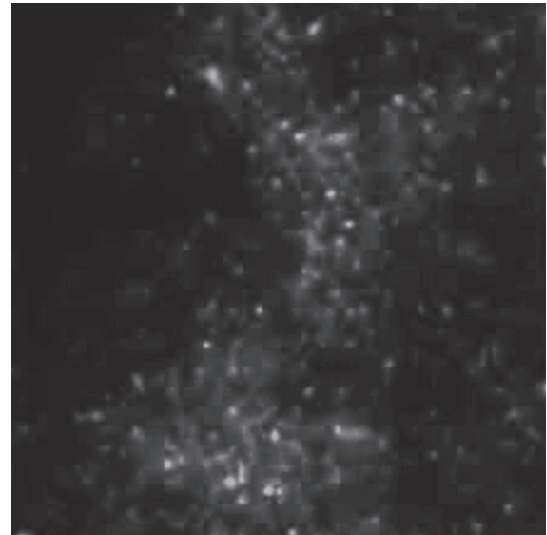


図 2. 蛍光タンパク (mCherry) を含んだ MV。Bar, 5 μm

6. 今後に向けて

これまでに MV 研究はその機能と形成機構を中心に行われてきた。その一方で、放出された MV がどのようにして細胞に付着し、さらには融合してその中身を受け渡すかについては全く解明されていない。MV の細胞に対する付着性に選択性があるのか、あるいは均等に付着されるのかについて明らかにすることは非常に興味をもたれる。ここを解明することによって、MV 形成、拡散、付着・融合の一連の流れ、つまりは“細菌間メンブランチラフィック”の全体像が解明され、さらなる応用展開も期待される。MV の機能についても、これまでに病原性への関与について研究されてきたが、植物内生細菌や腸内細菌などの存在を考えると宿主に対して協調的な作用を MV がもたらしていることも十分に考えうる。さらには、環境中での MV の役割についてはほとんど分かっていない。バイオフィーム中から MV が多く同定される事を考えると、環境中の至る所で MV が生産されていることが予測される。MV の全貌を解き明かすことによって、今後 MV を利用したバイオテクノロジー技術の真のポテンシャルが明らかになるとと思われる。MV 研究はまだまだ発展途上にあり、微生物学分野に今後大きなインパクトをもたらすことが期待される。

謝 辞

本研究の一部は若手研究 (A) 「ベシクルを介した微生物間ネットワークの解明とデザイン方法の創出」により助成された。

文 献

- 1) Baker, J.L., L. Chen, J.A. Rosenthal, D. Putnam, and M.P. DeLisa. 2014. Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles. *Curr. Opin. Biotechnol.* 29: 76-84.
- 2) Baumgarten, T., S. Sperling, J. Seifert, M. von Bergen, F.

- Steiniger, L.Y. Wick, and H.J. Heipieper. 2012. Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 6217–6224.
- 3) Biller, S.J., F. Schubotz, S.E. Roggensack, A.W. Thompson, R.E. Summons, and S.W. Chisholm. 2014. Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science.* 343: 183–186.
 - 4) Deatherage, B.L., J.C. Lara, T. Bergsbaken, S.L. Rassoulian Barrett, S. Lara, and B.T. Cookson. 2009. Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Mol. Microbiol.* 72: 1395–1407.
 - 5) Fang, H., M. Toyofuku, T. Kiyokawa, A. Ichihashi, K. Tateda, and N. Nomura. 2013. The Impact of Anaerobiosis on Strain-Dependent Phenotypic Variations in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 77: 1747–1752.
 - 6) Ionescu, M., P.A. Zaini, C. Baccari, S. Tran, A.M. da Silva, and S.E. Lindow. 2014. *Xylella fastidiosa* outer membrane vesicles modulate plant colonization by blocking attachment to surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111: E3910–E3918.
 - 7) Kadurugamuwa, J.L. and T.J. Beveridge. 1995. Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin: a novel mechanism of enzyme secretion. *J. Bacteriol.* 177: 3998–4008.
 - 8) Manabe, T., M. Kato, T. Ueno, and K. Kawasaki. 2013. Flagella proteins contribute to the production of outer membrane vesicles from *Escherichia coli* W3110. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 441: 151–156.
 - 9) Manning, A.J. and M.J. Kuehn. 2011. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol.* 11: 258.
 - 10) Mantri, C.K., C.H. Chen, X. Dong, J.S. Goodwin, S. Pratap, V. Paromov, and H. Xie. 2015. Fimbriae-mediated outer membrane vesicle production and invasion of *Porphyromonas gingivalis*. *MicrobiologyOpen.* 4: 53–65.
 - 11) Mashburn, L.M. and M. Whiteley. 2005. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature.* 437: 422–425.
 - 12) Mashburn-Warren, L., J. Howe, P. Garidel, W. Richter, F. Steiniger, M. Roessle, K. Brandenburg, and M. Whiteley. 2008. Interaction of quorum signals with outer membrane lipids: insights into prokaryotic membrane vesicle formation. *Mol. Microbiol.* 69: 491–502.
 - 13) Mashburn-Warren, L.M. and M. Whiteley. 2006. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 61: 839–846.
 - 14) Matsukawa, M. and E.P. Greenberg. 2004. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J. Bacteriol.* 186: 4449–4456.
 - 15) McBroom, A.J., A.P. Johnson, S. Vemulapalli, and M.J. Kuehn. 2006. Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *J. Bacteriol.* 188: 5385–5392.
 - 16) McBroom, A.J. and M.J. Kuehn. 2007. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol. Microbiol.* 63: 545–558.
 - 17) Prados-Rosales, R., B.C. Weinrick, D.G. Piqué, W.R. Jacobs, Jr., A. Casadevall, and G.M. Rodriguez. 2014. Role for *Mycobacterium tuberculosis* membrane vesicles in iron acquisition. *J. Bacteriol.* 196: 1250–1256.
 - 18) Schertzer, J.W., S.A. Brown, and M. Whiteley. 2010. Oxygen levels rapidly modulate *Pseudomonas aeruginosa* social behaviours via substrate limitation of PqsH. *Mol. Microbiol.* 77: 1527–1538.
 - 19) Schooling, S.R. and T.J. Beveridge. 2006. Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *J. Bacteriol.* 188: 5945–5957.
 - 20) Sonntag, I., H. Schwarz, Y. Hirota, and U. Henning. 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* 136: 280–285.
 - 21) Tashiro, Y., S. Ichikawa, T. Nakajima-Kambe, H. Uchimura, and N. Nomura. 2010. *Pseudomonas* quinolone signal affects membrane vesicle production in not only Gram-negative but also Gram-positive bacteria. *Microbes and environments/JSME.* 25: 120–125.
 - 22) Tashiro, Y., A. Inagaki, M. Shimizu, S. Ichikawa, N. Takaya, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2011. Characterization of phospholipids in membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75: 605–607.
 - 23) Tashiro, Y., N. Nomura, R. Nakao, H. Senpuku, R. Kariyama, H. Kumon, S. Kosono, H. Watanabe, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2008. Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190: 3969–3978.
 - 24) Tashiro, Y., R. Sakai, M. Toyofuku, I. Sawada, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2009. Outer membrane machinery and alginate synthesis regulators control membrane vesicle production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 191: 7509–7519.
 - 25) Tashiro, Y., M. Toyofuku, T. Nakajima-Kambe, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2010. Bicyclic compounds repress membrane vesicle production and *Pseudomonas* quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 123–130.
 - 26) Tashiro, Y., H. Uchiyama, and N. Nomura. 2012. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* 14: 1349–1362.
 - 27) Toyofuku, M., N. Nomura, T. Fujii, N. Takaya, H. Maseda, I. Sawada, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2007. Quorum sensing regulates denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 189: 4969–4972.
 - 28) Toyofuku, M., N. Nomura, E. Kuno, Y. Tashiro, T. Nakajima, and H. Uchiyama. 2008. Influence of the *Pseudomonas* quinolone signal on denitrification in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 190: 7947–7956.
 - 29) Toyofuku, M., G.A. O’toole, and N. Nomura. 2015. Anaerobic Life Style of *Pseudomonas aeruginosa*. In J. Ramos, B. Goldberg, and A. Filloux (eds.), *Pseudomonas*. Volume 7. Springer.
 - 30) Toyofuku, M., B. Roschitzki, K. Riedel, and L. Eberl. 2012. Identification of proteins associated with the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm extracellular matrix. *J. Proteome. Res.* 11: 4906–4915.
 - 31) Toyofuku, M., S. Zhou, I. Sawada, N. Takaya, H. Uchiyama, and N. Nomura. 2014. Membrane vesicle formation is associated with pyocin production under denitrifying conditions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ. Microb.* 16: 2927–2938.
 - 32) Yawata, Y., N. Nomura, and H. Uchiyama. 2008. Development of a novel biofilm continuous culture method for simultaneous assessment of architecture and gaseous metabolite production. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 5429–5435.
 - 33) Zhou, L., R. Srisatjaluk, D.E. Justus, and R.J. Doyle. 1998. On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 223–228.